Monolisa™ HBs Ag ULTRA

1 plaque - 96 tests 72346

5 plaques - 480 tests 72348

TROUSSE POUR LA DÉTECTION DE L'ANTIGÈNE DE SURFACE DU VIRUS DE L'HÉPATITE B PAR TECHNIQUE IMMUNO-ENZYMATIQUE DANS LE SÉRUM OU LE PLASMA HUMAIN

IVD

Contrôle de qualité du fabriquant

Tous les produits fabriqués et commercialisés par la société Bio-Rad sont placés sous un système d'assurance qualité de la réception des matières premières jusqu'à la commercialisation des produits finis.

Chaque lot du produit fini fait l'objet d'un contrôle de qualité et n'est commercialisé que s'il est conforme aux critères d'acceptation.

La documentation relative à la production et au contrôle de chaque lot est conservée par notre société.

BIO-RAD

TABLE DES MATIÈRES

1 - BUT DU DOSAGE

2 - INTÉRÊT CLINIQUE

3 - PRINCIPE DU TEST Monolisa™ HBs Ag ULTRA

4 - COMPOSITION DE LA TROUSSE Monolisa™ HBs Ag ULTRA

5 - PRÉCAUTIONS

6 - CONSIGNES D'HYGIÈNE ET DE SÉCURITÉ

7 - MATÉRIEL NÉCESSAIRE MAIS NON FOURNI

8 - PRÉPARATION DES RÉACTIFS

9 - CONSERVATION - VALIDITÉ

10 - ÉCHANTILLONS

11 - MODE OPÉRATOIRE

12 - ADAPTATION

13 - CALCUL ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

14 - VÉRIFICATION SPECTROPHOTOMÉTRIQUE DU DÉPÔT DES ÉCHANTILLONS ET DU CONJUGUÉ

15 - PERFORMANCES

16 - LIMITES DU TEST

17 - RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1 - BUT DU DOSAGE

Monolisa™ HBs Ag ULTRA est une technique immuno-enzymatique de type "sandwich" en 1 temps pour la détection de l'antigène de surface du virus de l'Hépatite B (Ag HBs) dans le sérum ou le plasma humain.

2 - INTÉRÊT CLINIQUE

La présence de l'Ag HBs dans le sérum témoigne d'une infection par le virus de l'Hépatite B. Il est le premier marqueur à apparaître et peut précéder de 2 à 3 semaines les signes cliniques et biologiques de la maladie. Sa présence peut être très brève (quelques jours) ou très longue (plusieurs années). Au delà de 6 mois de persistence de l'Ag HBs, l'Hépatite est qualifiée de "chronique".

L'existence de nombreux porteurs chroniques asymptomatiques fait que l'Hépatite B représente un risque transfusionnel important. La prévention de la transmission repose sur la détection de l'Ag HBs à chaque don de sang.

3 - PRINCIPE DU TEST Monolisa™ HBs Ag ULTRA

Monolisa™ HBs Ag ULTRA est une technique immuno-enzymatique de type "sandwich" en 1 temps utilisant des anticorps monoclonaux et des anticorps polyclonaux sélectionnés pour leur capacité à se lier aux différents sous-types de l'Ag HBs actuellement reconnus par l'OMS et la plupart des souches variantes de l'hépatite B.

La phase solide de Monolisa™ HBs Ag ULTRA est sensibilisée avec des anticorps monoclonaux.

Les conjugués de Monolisa™ HBs Ag ULTRA sont basés sur l'utilisation des anticorps monoclonaux de souris et des anticorps polyclonaux de chèvre contre l'Ag HBs. Ces anticorps sont couplés à la peroxydase.

Le dosage comprend les étapes suivantes :

1) Distribution des échantillons et des sérums de contrôle dans les cupules de la microplaque.
   Cette distribution peut être contrôlée visuellement : en effet, il y a une nette différence de coloration entre une cupule vide et une cupule contenant un échantillon. Elle peut être aussi contrôlée par lecture spectrophotométrique à 490/620-700 nm (optionnel).
2) Distribution du conjugué
   Cette distribution peut être également contrôlée visuellement : en effet, après rajout du conjugué initialement rouge, la cupule se colore en rouge. Elle peut être contrôlée par lecture spectrophotométrique à 490/620-700 nm (optionnel), la distribution des échantillons peut aussi être contrôlée à ce stade de la manipulation par lecture spectrophotométrique à 490/620-700 nm.
3) Après incubation pendant une heure et demi à 37°C, le conjugué non lié est éliminé par lavage.
4) Distribution de la solution de révélation de l'activité enzymatique.
   Cette distribution peut être également contrôlée visuellement : il y a une nette différence de coloration entre une cupule vide et une cupule contenant le substrat de couleur rose. Elle peut être contrôlée par lecture spectrophotométrique à 490 (optionnel).
5) Après 30 minutes d'incubation en présence du substrat à l'obscurité et à température ambiante (18-30°C), la présence du conjugué est révélée par un changement de couleur.
6) Distribution de la solution d'arrêt.
   Cette distribution peut être également contrôlée visuellement : La coloration du substrat, rosée (pour les échantillons négatifs) ou bleu (pour les échantillons positifs), disparaît des cupules qui deviennent incolores (pour les échantillons négatifs) ou jaunes (pour les échantillons positifs) après addition de la solution d'arrêt.
7) Lecture des densités optiques à 450/620-700 nm et interprétation des résultats.

4 - COMPOSITION DE LA TROUSSE Monolisa™ HBs Ag ULTRA

Tous les réactifs sont destinés exclusivement pour le diagnostic *in vitro*.

ETIQUETAGE	NATURE DES RÉACTIFS	PRÉSENTATION	
		72346	72348
R1	**MICROPLAQUE :** 12 barrettes de 8 cupules sensibilisées avec des anticorps monoclonaux anti-HBs (souris)	1 microplaque	5 microplaques
R2	**SOLUTION DE LAVAGE concentrée (20X)** Tampon tris, NaCl, pH = 7,4 Conservateur : ProClin™ 300 (0,04 %)	1 flacon 70 ml	1 flacon 235 ml
R3	**CONTRÔLE NÉGATIF** Tampon Tris HCl, contenant de la SAB. Conservateur : ProClin™ 300 (0,1 %)	2 flacons 2 x 2,5 ml	2 flacons 2 x 2,5 ml
R4	**CONTRÔLE POSITIF (Humain)** Tampon Tris HCl, contenant de la SAB, additionné d'un mélange d'Ag HBs purifiés des sous-types ad et ay, (humains) Conservateur : ProClin™ 300 (0,1 %)	1 flacon 2,5 ml	1 flacon 2,5 ml
R6	**DILUANT CONJUGUÉ :** Tampon Tris HCl pH 7.4 additionné de BSA, de Tween® 20, d'immunoglobulines de boeuf et de souris et d'un indicateur coloré témoin de dépôt Conservateurs : Ciprofloxacine (10 µg/ml), ProClin™ 300 (0,1 %)	1 flacon 8 ml	2 flacons 2 x 18 ml
R7	**CONJUGUÉ** Anticorps monoclonaux anti-HBs de souris et anticorps polyclonaux anti-HBs de chèvre couplés à la peroxydase. Lyophilisé.	1 flacon qsp 8 ml	2 flacons qsp 2 x 18 ml
R8	**TAMPON SUBSTRAT DE LA PEROXYDASE** Solution d'acide citrique et d'acétate de sodium pH 4,0 contenant 0,015% d'H_2O_2 et 4% de diméthylsulfoxyde (DMSO)	1 flacon 60 ml	2 flacons 2 x 60 ml
R9	**CHROMOGÈNE** coloré en rose : solution contenant du tétraméthyl benzidine (TMB)	1 flacon 5 ml	2 flacons 2 x 5 ml
R10	**SOLUTION D'ARRÊT** Solution d'acide sulfurique 1 N	1 flacon 28 ml	3 flacons 3 x 28 ml

5 - PRÉCAUTIONS

La qualité des résultats dépend du respect des bonnes pratiques de laboratoire suivantes :

- Le nom du test ainsi qu'un numéro d'identification spécifique du test sont mentionnés sur le cadre de chaque microplaque. Ce numéro d'identification spécifique figure également sur chaque barrette.
  Monolisa® HBs Ag ULTRA : Numéro spécifique d'identification = 51
  Cette identification doit être vérifiée avant chaque utilisation. Toute barrette dont le numéro de test est absent, ou différent de celui correspondant au test réalisé, ne doit pas être utilisée.
- Ne pas utiliser des réactifs dont la validité est expirée.
- Ne pas mélanger des réactifs de lots différents au cours d'un même essai.
  REMARQUE : Il est possible d'utiliser d'autres lots de solution de lavage (R2, identifié 20X en vert sur l'étiquette), de tampon substrat (R8, identifié TMB buf. en bleu), de chromogène (R9, identifié TMB 11X en violet) et de solution d'arrêt (R10, identifié 1N en rouge), que ceux fournis dans la trousse sous réserve d'utiliser un seul et même lot de ceux-ci au cours d'un même essai. Ces réactifs peuvent être utilisés avec d'autres produits de Bio-Rad. De plus, la solution de lavage (R2, identifié 20X en vert sur l'étiquette), peut être mélangée avec l'une des deux autres solutions de lavage inclues dans les différents kits réactifs Bio-Rad (R2, identifié 10X en bleu ou 10X en orange sur l'étiquette) correctement reconstituées, à condition qu'un seul mélange soit utilisé pour une même manipulation donnée. Contacter nos services techniques pour obtenir des informations détaillées.
- Avant utilisation, attendre 30 minutes que les réactifs s'équilibrent à la température ambiante (18-30°C) et une heure pour la solution de lavage diluée (R2).
- Reconstituer soigneusement les réactifs en évitant toute contamination.
- Ne pas réaliser le test en présence de vapeurs réactives (acides, alcalines, aldéhydes) ou de poussières qui pourraient altérer l'activité enzymatique du conjugué.

- Utiliser une verrerie parfaitement lavée et rincée à l'eau distillée ou de préférence du matériel à usage unique.
- Ne pas laisser la microplaque sécher entre la fin du lavage et la distribution des réactifs.
- La réaction enzymatique est très sensible à tous métaux ou ions métalliques. En conséquence, aucun élément métallique ne doit entrer en contact avec les différentes solutions contenant le conjugué ou la solution substrat.
- La solution de révélation (tampon substrat + chromogène) doit être colorée en rose. L'apparition d'une autre coloration dans les minutes suivant la reconstitution indique que le réactif est inutilisable et doit être remplacé.

  Pour cette préparation, utiliser de préférence des récipients et du matériel de distribution en plastique à usage unique ou de la verrerie préalablement lavée à l'acide chlorhydrique 1N, rincée à l'eau distillée et séchée. Conserver cette solution à l'abri de la lumière.
- Utiliser un cône de distribution neuf pour chaque sérum.
- Le lavage des cupules est une étape essentielle de la manipulation : respecter le nombre de cycles de lavages prescrits, et s'assurer que toutes les cupules sont complètement remplies, puis complètement vidées. Un mauvais lavage peut entraîner des résultats incorrects.
- Ne jamais utiliser le même récipient pour distribuer le conjugué et la solution de révélation.
- Vérifier l'exactitude et la bonne précision des pipettes et le bon fonctionnement des appareils utilisés.
- Ne pas changer le protocole opératoire.

6 - CONSIGNES D'HYGIÈNE ET DE SÉCURITÉ

Tous les réactifs de la trousse sont destinés à l'usage du diagnostic "*in vitro*".

- Porter des gants à usage unique lors de la manipulation des réactifs et des échantillons et se laver les mains soigneusement après leur manipulation.
- Ne pas "pipeter à la bouche"
- Le contrôle positif (R4) contient de l'Ag HBs de sous-type ad et ay purifié à partir de plasmas humains négatifs en anticorps anti-VIH1 et 2 et anticorps anti-VHC, et inactivés par la chaleur.
- Du fait qu'aucune méthode ne peut garantir de façon absolue l'absence des virus VIH, VHB, VHC ou d'autres agents infectieux, considérer les réactifs d'origine humaine, ainsi que les échantillons de patients, comme potentiellement infectieux et les manipuler avec les précautions d'usage.
- Considérer le matériel directement en contact avec les échantillons et les réactifs d'origine humaine, ainsi que les solutions de lavage, comme des produits contaminés.
- Eviter les éclaboussures d'échantillons ou de solutions les contenant.
- Les surfaces souillées seront nettoyées par de l'eau de javel diluée à 10%. Si le liquide contaminant est un acide, les surfaces souillées seront neutralisées au préalable avec du bicarbonate de soude, puis nettoyées à l'aide de l'eau de javel et séchées avec du papier absorbant. Le matériel utilisé pour le nettoyage devra être jeté dans un conteneur spécial pour déchets contaminés.
- Les échantillons, les réactifs d'origine humaine ainsi que le matériel et les produits contaminés seront éliminés après décontamination :
  - soit par trempage dans de l'eau de javel à la concentration finale de 5% d'hypochlorite de sodium (1 volume d'eau de javel pour 10 volumes de liquide contaminé ou d'eau) pendant 30 minutes,
  - soit par autoclavage à 121°C pendant 2 heures minimum. L'autoclave est la meilleure méthode pour inactiver les virus VIH et VHB.

  ATTENTION : NE PAS INTRODUIRE DANS L'AUTOCLAVE DES SOLUTIONS CONTENANT DE L'HYPOCHLORITE DE SODIUM.
- Ne pas omettre de neutraliser et/ou d'autoclaver les solutions ou effluents de lavage ou tout liquide contenant des échantillons biologiques avant de les jeter dans l'évier.
- La fiche de données de sécurité est disponible sur demande.
- La manipulation et l'élimination des produits chimiques doivent être effectuées selon les bonnes pratiques de laboratoire.
- Eviter tout contact du tampon substrat, du chromogène et de la solution d'arrêt avec la peau et les muqueuses (toxicité, irritation ou brûlure).

- Certains réactifs contiennent du ProClin™ 300 (0.04%, 0.1 % et/ou 0,5%)

Xi Irritant
R43 : peut entraîner une sensibilisation par contact avec la peau
S28-37 : Après contact avec la peau, se laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et du savon. Porter des gants appropriés.

- La fiche de données de sécurité est disponible sur demande.

7 - MATÉRIEL NÉCESSAIRE MAIS NON FOURNI

- Eau distillée.
- Hypochloride de sodium (Eau de javel) et bicarbonate de soude.
- Pipettes automatiques ou semi-automatiques réglables ou fixes pouvant distribuer 50 µl, 100 µl, 1000 µl et 10 ml.
- Eprouvettes graduées de 100 ml et 1000 ml.
- Conteneur de déchets contaminés.
- Bain-marie, ou incubateur sec*, pouvant être thermostaté à 37°C ± 1°C*(*)*.
- Système de lavage, automatique*, semi-automatique* ou manuel pour microplaque.
- Appareil de lecture* pour microplaques équipés de filtres 450, 490 et 620-700 nm.
- Papier absorbant.

(*) Nous consulter pour une information précise concernant les appareils validés par nos services techniques.

8 - PRÉPARATION DES RÉACTIFS

Avant utilisation des réactifs de la trousse Monolisa™ HBs Ag ULTRA, les laisser s'équilibrer à température ambiante (18-30°C).

1) Réactifs prêts à l'emploi

Réactif 1 (R1) : Microplaque
Chaque support cadre contenant 12 barrettes est conditionné en sachet aluminium scellé. Couper le sachet à l'aide de ciseaux ou scalpel 0,5 à 1 cm au-dessus de la soudure. Ouvrir le sachet et sortir le cadre. Replacer dans le sachet les barrettes inutilisées. Refermer le sachet soigneusement et le replacer à +2-8°C.
Réactif 3 (R3) : Contrôle Négatif
Réactif 4 (R4) : Contrôle Positif
Réactif 10 (R10) : Solution d'arrêt

2) Réactifs à reconstituer

Solution de lavage (concentrée 20X) : Réactif 2 (R2)
Diluer au 1/20ème la solution de lavage R2 dans de l'eau distillée. Préparer 800 ml pour une microplaque de 12 barrettes.
Conjugué (R6 + R7)
Taper doucement le flacon de conjugué lyophilisé (R7) sur la paillasse pour détacher toute substance pouvant adhérer au bouchon de caoutchouc.
Ouvrir le flacon de conjugué lyophilisé (R7) et y transvaser le contenu d'un flacon de diluant pour conjugué (R6). Reboucher et laisser reposer 10 minutes en homogénéisant de temps en temps pour faciliter la dissolution.
Solution de révélation enzymatique (R8 + R9)
Diluer le réactif R9 dans le réactif R8 au 1/11ème (exemple : 1 ml de réactif R9 dans 10 ml de réactif R8) sachant que 10 ml sont nécessaires et suffisants pour traiter 12 barrettes. Cette solution reste stable 6 heures à l'obscurité. Homogénéiser.

9 - CONSERVATION - VALIDITÉ

Conserver la trousse à + 2-8°C avant utilisation.
Chaque élément de la trousse Monolisa™ HBs Ag ULTRA conservé à +2-8°C peut être utilisé après une première ouverture jusqu'à la date de péremption indiquée sur le coffret, sauf indication spécifique :
R1 : Après ouverture du sachet sous vide, les barrettes conservées à +2-8°C dans leur sachet d'origine, refermé avec soin, sont stables pendant 1 mois.
R2 : La solution de lavage diluée peut être conservée à +2- 30°C pendant 2 semaines. La solution de lavage concentrée (R2) peut être conservée à +2- 30°C.
R6 + R7 : La solution de conjugué, stockée à +2-8°C, est utilisable pendant 1 mois et est utilisable à température ambiante (18-30°C) pendant 8 heures.
R8 + R9 : Après reconstitution, la solution de révélation est utilisable 6 heures à l'obscurité à température ambiante (18-30°C).

10 - ÉCHANTILLONS

Prélever un échantillon de sang selon les pratiques en usage.
Les tests sont effectués sur des échantillons non dilués de sérum ou de plasma (collectés avec des anticoagulants comme l'EDTA, l'héparine, le citrate, l'ACD).

Extraire le sérum ou le plasma du caillot ou des globules rouges dès que possible pour éviter toute hémolyse. Une hémolyse très prononcée peut affecter les performances du test. Les échantillons présentant des agrégats doivent être clarifiés par centrifugation avant le test. Les particules ou agrégats de fibrine en suspension peuvent donner des résultats faussement positifs.
Les échantillons seront conservés à + 2 - 8°C si le dépistage est effectué dans les 7 jours ou peuvent être conservés congelés à -20°C pour plusieurs mois.
Eviter les congélations/ décongélations répétées. Les échantillons ayant été congelés et décongelés plus de 3 fois ne doivent pas être utilisés.
Si les échantillons doivent voyager, les emballer selon la réglementation en usage pour le transport des agents étiologiques et les transporter préférablement congelés.
NE PAS UTILISER DE SÉRUMS CONTAMINÉS, HYPERLIPÉMIQUES OU HYPERHÉMOLYSES.
REMARQUE : Aucune interférence n'a été mise en évidence sur des échantillons contenant jusqu'à 90 g/l d'albumine, 100 mg/l de bilirubine, ainsi que sur des échantillons lipémiques contenant jusqu'à 36 g/l de trioléine et sur des échantillons hémolysés contenant jusqu'à 1 g/l d'hémoglobine.

11 - MODE OPÉRATOIRE

Suivre strictement le protocole proposé.
Utiliser les contrôles positif (R4) et négatif (R3) pour chaque série de déterminations pour valider les résultats du test.
Suivre les bonnes pratiques de laboratoire.

1) Etablir soigneusement le plan de distribution et d'identification des échantillons.
2) Préparer la solution de lavage R2 (cf chapitre 8).
3) Préparer la solution de conjugué (R6 + R7) (cf. chapitre 8).
4) Sortir de l'emballage protecteur le cadre support et le nombre de barrettes nécessaires (R1). Remettre les barrettes non utilisées dans l'emballage et refermer ce dernier.
5) Distribuer dans les cupules dans l'ordre suivant (plan de plaque conseillé) :
   - Cupules A1, B1, C1 et D1 : 100 µl de contrôle négatif (R3)
   - Cupule E1: 100 µl de contrôle positif (R4)
   - Cupule F1:100 µl du premier échantillon à tester si cette cupule n'est pas utilisée comme cupule témoin pour la validation du dépôt des échantillons et du conjugué (optionnel)
   - Cupules G1, H1,... etc: 100 µl d'échantillons à tester.

   En fonction du système utilisé, il est possible de modifier la position ou l'ordre de distribution des témoins.
   NB : La distribution des échantillons peut être contrôlée à ce stade de la manipulation, en effet il y a une nette différence de coloration entre une cupule vide et une cupule contenant de l'échantillon (cf. paragraphe 14 pour la vérification automatique - VALIDATION SPECTROPHOTOMÉTRIQUE DU DÉPÔT DES ÉCHANTILLONS ET DU CONJUGUÉ).
6) Secouer la solution du conjugué avant utilisation. Homogénéiser.Distribuer rapidement 50 µl de la solution reconstituée de conjugué (R6 + R7) dans toutes les cupules.
   Homogénéiser le mélange réactionnel.
   NB : La distribution des échantillons peut aussi être contrôlée visuellement à ce stade de la manipulation, tout comme la distribution du conjugué peut également être contrôlée visuellement : après rajout du conjugué, les cupules contenant des échantillons se colorent en rouge. (cf. paragraphe 14 pour la vérification automatique - VALIDATION SPECTROPHOTOMÉTRIQUE DU DÉPÔT DES ÉCHANTILLONS ET DU CONJUGUÉ).
7) Lorsque cela est possible recouvrir d'un film adhésif et incuber pendant 1 heure et 30 ± 5 minutes à 37 ± 1°C.
8) Retirer le film adhésif, aspirer le contenu de chaque cupule et laver au moins 5 fois. Veillez à ce que le volume résiduel n'excède pas 10 µl (éventuellement, sécher la plaque par retournement sur une feuille de papier absorbant).
9) Distribuer rapidement dans toutes les cupules 100 µl de la solution de révélation de l'activité enzymatique (R8 + R9) préalablement préparée. Laisser la réaction se développer à l'obscurité pendant 30 ± 5 minutes à température ambiante (18 à 30°C). Lors de cette incubation, ne pas utiliser de film adhésif.
   N.B.: La distribution de la solution de révélation, qui est colorée en rose, peut être contrôlée visuellement à ce stade de manipulation : Il y a une différence de coloration significative entre une cupule vide et une cupule contenant la solution de révélation rosée. (se reporter au paragraphe 14 pour la vérification automatique VÉRIFICATION SPECTROPHOTOMÉTRIQUE DU DÉPÔT DES ÉCHANTILLONS ET DES RÉACTIFS).
10) Ajouter 100 µl de la solution d'arrêt (R10) en adoptant la même séquence et le même rythme de distribution que pour la solution de révélation. Homogénéiser le mélange réactionnel.
    N.B.: La distribution de la solution d'arrêt, qui est incolore, peut être contrôlée visuellement à ce stade de la manipulation. La coloration du substrat, rosée (pour les échantillons négatifs) ou bleu (pour les échantillons positifs), disparaît des cupules qui deviennent incolores (pour les échantillons négatifs) ou jaunes (pour les échantillons positifs) après addition de la solution d'arrêt.

11) Essuyer soigneusement le dessous des plaques. **Attendre au moins 4 minutes après la distribution de la solution d'arrêt avant la lecture** et dans les 30 minutes qui suivent l'arrêt de la réaction, lire la densité optique à 450/620 nm à l'aide d'un lecteur de plaques.
12) S'assurer avant la transcription des résultats de la concordance entre la lecture et le plan de distribution et d'identification des plaques et des échantillons.

12 - ADAPTATION

LAVAGE : Il est indispensable de respecter les procédures de lavage afin d'obtenir les performances maximales du test.
Pour certains laveurs, il peut être nécessaire d'optimiser la procédure de lavage (augmentation du nombre de cycle de lavage et/ou du volume de tampon de lavage pour chaque cycle, temps de trempage) pour obtenir un niveau acceptable de bruits de fond (DO) pour les échantillons négatifs.
Nous consulter pour les procédures spécifiques et les adaptations.

13 - CALCUL ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

1) Calcul de la densité optique moyenne du contrôle négatif : DO R3

Exemple

Contrôle négative R3	DO
1	0,030
2	0,031
3	0,032
4	0,027

Total DO R3 = 0,120
Total DO R3 /4 = 0.030 = moyenne $\overline{DO\ R3}$

2) Calcul de la valeur seuil

Pour chaque plaque, la valeur seuil est égale à : DO R3 + 0,050

Exemple

$\overline{DO\ R3}$ = 0,030
Valeur seuil (VS) = 0,030 + 0,050 = 0,080

3) Conditions de validation du test

Toutes les valeurs du contrôle négatif doivent être inférieures ou égales à 0,080 unité de densité optique.
La valeur du contrôle positif (DO R4) doit être supérieure ou égale à 1.000.
Si la valeur du contrôle négatif ne respecte pas la norme ou est supérieure de plus de 40 % par rapport à la moyenne des contrôles négatifs ($\overline{DO\ R3}$), éliminer la et refaire le calcul de la moyenne de contrôle négatif sur les 3 autres valeurs. Une seule valeur peut être éliminée.
Dans le cas de bruit de fond très bas pour le contrôle négatif R3 (moyenne des valeurs négatives R3 inférieures à 0,010) ne pas utiliser le critère de rejet pour le contrôle négatif R3.
Le test est à recommencer si tous les contrôles sont hors de l'intervalle des valeurs ci-dessus.

4) Calcul des ratios

Pour chaque échantillon, calculer le ratio :

$$\text{Ratio} = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{VS}}$$

5) Interprétation des résultats

Les échantillons dont le ratio est inférieur à 1 sont considérés négatifs d'après le test Monolisa™ HBs Ag ULTRA.
Les échantillons dont le ratio est compris entre 0,9 et 1 doivent être interprétés avec prudence. Il est conseillé de retester les échantillons correspondants en double lorsque les systèmes utilisés et les procédures du laboratoire le permettent.
Les échantillons dont le ratio est égal ou supérieur à 1 sont considérés comme initialement positifs et doivent être retestés en double avant l'interprétation finale.
Si après répétition de l'essai, pour un échantillon, le ratio des 2 doublets est inférieur à 1, le résultat initial est non reproductible et l'échantillon est déclaré négatif selon le test Monolisa™ HBs Ag ULTRA.
Pour les échantillons initiaux réactifs ou douteux (0,9< ratio < 1), après répétition de l'essai, si au moins un ratio des 2 doublets est égal ou supérieur à 1, le résultat initial est reproductible et l'échantillon est déclaré positif selon le test Monolisa™ HBs Ag ULTRA, en tenant en compte des limites du test décrites ci-après.
Les échantillons qui ont été retestés en double et trouvés négatifs selon le test Monolisa™ HBs Ag ULTRA, mais pour lesquels une des valeurs est proche de la valeur seuil (ratio entre 0.9 et 1) devraient être considérés avec prudence. Il est conseillé de retester ces patients avec une autre méthode ou sur un autre prélèvement.
Dans le cas de DO très basses pour les échantillons testés (DO négative) et quand la présence des échantillons ainsi que des réactifs est contrôlée, les résultats peuvent être interprétés comme négatifs.
Pour vérifier la spécificité de la réaction, tout échantillon positif selon les critères d'interprétation du test

Monolisa™ HBs Ag ULTRA devrait être confirmé par une technique de neutralisation de l'Ag HBs.
Les réactions non-répétables sont souvent causées par :

- Lavage des microplaques inadéquat.
- Contamination des échantillons négatifs du sérum ou du plasma avec une concentration forte en Ag HBs,
- Contamination de la solution de révélation par des agents oxydants (eau de javel, ions métalliques, etc...).
- Contamination de la solution d'arrêt.

14 - VÉRIFICATION SPECTROPHOTOMÉTRIQUE DU DÉPÔT DES ÉCHANTILLONS ET DU CONJUGUÉ

Vérification du dépôt des échantillons et du conjugué

1) Vérification du dépôt des échantillons

   La présence des échantillons dans les cupules peut être vérifiée avant la distribution du conjugué par lecture spectrophotométrique à 490/620-700 nm : une cupule contenant un échantillon présente une DO comprise entre 0,050 et 0.900.

   REMARQUE : il y a une nette différence de coloration entre une cupule vide transparente et une cupule contenant un échantillon.

2) Vérification du dépôt du conjugué

   Lorsque la présence des échantillons a été vérifiée spectrophotométriquement comme décrit précédemment, l'ajout de conjugué peut alors être contrôlé par une lecture spectrophotométrique à 490-620/700 nm : une cupule contenant du conjugué présente alors une DO supérieure à 1,100.

   REMARQUE : Les cupules contenant les échantillons sont jaunâtres et deviennent rouges après ajout du conjugué coloré.

3) Vérification du dépôt des échantillons et du conjugué simultanément (technique uniquement spectrophotométrique).

   Quand la présence des échantillons n'a pas été vérifiée par lecture automatique comme décrit ci-dessus, la présence simultanée des échantillons et du conjugué dans les cupules peut être vérifiée par lecture automatique à 490/620-700 nm à condition d'avoir une cupule avec le conjugé seul. Le delta de leurs DO doit être supérieure à 0.35 comme ci-après :

   [DO (échantillon + conjugué) – DO conjugué seul] ≥ 0.35

Vérification du dépôt de la solution de révélation

Il est possible de vérifier la présence de la solution de révélation rosée par lecture automatique à **490 nm** : une cupule contenant la solution de révélation doit avoir une densité optique supérieure à **0.100** (une DO plus faible indique une mauvaise distribution de la solution de révélation).

15 - PERFORMANCES

Les performances de Monolisa™ HBs Ag ULTRA ont été déterminées à partir de tests réalisés sur des échantillons de donneurs de sang non sélectionnés, des échantillons de patients hospitaliers atteints d'Hépatite B aigue, d'Hépatite B chronique, des échantillons de patients présentant diverses pathologies sans relation avec le virus de l'Hépatite B, des échantillons commerciaux ainsi que des panels de séroconversion.
Le seuil de sensibilité a été évalué à partir du panel français de la SFTS et de l'étalon de l'OMS.

Spécificité

La spécificité chez 9894 donneurs de sang non sélectionnés provenant de 3 sites différents a été estimée à 99.94% (9887/9893). Une réaction répétée d'un échantillon a été confirmée positive pour l'Ag HBs.
L'étude de spécificité clinique a été effectuée dans un laboratoire hospitalier (Centre d'Hépathologie).
Sur 200 échantillons hospitaliers testés, 2 échantillons ont été trouvés réactifs répétables (un a été trouvé douteux en première intention (ratio =0.97), positif à 1.87 après retest, le 2ème avec des ratios de 2.29 et 1.99).
289 patients présentant des pathologies ou des états sans relation avec l'Hépatite B (femme enceinte, facteur rhumatoïde, Ig anti-nucléaires, Ig souris ou autres infections virales ou bactériennes) ont été testés avec Monolisa™ HBs Ag ULTRA. 11 échantillons trouvés positifs répétables ont été contrôlés avec un test EIA commercial et également à l'aide d'un test de neutralisation. 10 des 11 échantillons positifs répétables en Monolisa™ HBs Ag ULTRA ont été obtenus positifs avec ce test Ag HBs EIA commercial. Un échantillon a été trouvé non interprétable avec le test de neutralisation et a été retiré du calcul final; 2 échantillons n'ont pas été neutralisés; l'un provenant d'un échantillon positif IgG HSV, l'autre d'un échantillon de myélome également trouvé positif avec le test EIA commercial utilisé en comparaison conduisant à une spécificté de 99.28% (276/278). Les 9 autres échantillons positifs IgG HSV et les 9 échantillons de myélome ont été trouvés négatifs avec Monolisa™ HBs Ag ULTRA.

Sensibilité Analytique

Le seuil de sensibilité du test a été estimé inférieur à 0.06 ng/ml d'Ag HBs à partir du panel français SFTS 2001 et inférieur à 0.050 IU/ml pour l'étalon OMS.
Les sous-types suivants du panel SFTS 2001 : adw2, adw4, adr, ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayw5 et ayr ont tous été trouvés positifs avec un ratio supérieur à 5 avec le test Monolisa™ HBs Ag ULTRA.

Sensibilité

Les études de sensibilité effectuées sur 428 échantillons positifs provenant du suivi des patients atteints d'Hépatite B chronique, d'Hépatite B aigüe ont démontré une sensibilité de 100%.

Un panel de 15 protéines recombinantes mimant les plus importantes mutations en séquences d'acides aminés de l'Ag HBs a été testé et a été entièrement détecté avec Monolisa™ HBs Ag ULTRA.

Un total de 60 panels de séroconversions commerciaux d'Hépatite B (293 échantillons) a été testé et comparé à des tests immunoenzymatiques disponibles sur le marché.

Monolisa™ HBs Ag ULTRA a montré des résultats équivalent à Monolisa™ HBs Ag Plus dans 29 séroconversions.

Monolisa™ HBs Ag ULTRA a détecté les seroconversions avec 1 prélèvement d'avance dans 28 séroconversions, avec 2 prélèvements d'avance pour 2 séroconversions et avec 5 prélèvements d'avance dans 1 séroconversion.

Précision

La précision du test Monolisa™ HBs Ag ULTRA a été déterminée par l'analyse de 4 échantillons : 1 échantillon négatif, 2 échantillons positifs en Ag HBs (éch. 2 et 3) et un échantillon fortement positif en Ag HBs.

La répétabilité (intra-essai) a été évaluée par l'analyse de ces 4 échantillons qui ont été testés 30 fois au cours de la même manipulation.

La reproductibilité (inter-essai) a été évaluée par l'analyse de ces 4 mêmes échantillons qui ont été testés en double pendant 20 jours à raison de 2 essais indépendants chaque jour. Les résultats sont regroupés dans les tableaux suivants :

Tableau 1 : Répétabilité intra - essai

n = 30	échantillon 1	échantillon 2	échantillon 3	échantillon 4
moyenne des ratios	0.38	3.17	8.92	14.63
déviation standard (SD)	0.04	0.12	0.34	0.91
CV (%) ratios	**10.59 %**	**3.83 %**	**3.77 %**	**6.19 %**

Tableau 2 : Reproductibilité inter - essai

n = 40	échantillon 1	échantillon 2	échantillon 3	échantillon 4
moyenne des ratios	0.48	3.06	8.02	13.85
déviation standard (SD)	0.087	0.251	0.751	1.471
CV (%) ratios	**18.1 %**	**8.2 %**	**9.36 %**	**10.63 %**

16 - LIMITES DU TEST

- Un résultat négatif signifie que l'échantillon contrôlé ne contient pas d'Ag HBs détectable par le test Monolisa™ HBs Ag ULTRA. Toutefois dans la mesure où des taux très faibles en Ag HBs peuvent ne pas être détectés, un tel résultat négatif n'exclut pas la possibilité d'une infection par le virus de l'hépatite B.
- De plus, plusieurs auteurs ont signalé dans la littérature des cas d'hépatite B (aiguë ou chronique) dans lesquels de l'ADN viral peut être détecté en l'absence d'antigène de surface (patients Ag HBs négatifs). Ces profils anormaux, quoique rares, sont la conséquence de mutations génétiques possibles, soit au niveau des gènes S et pré-S (entraînant la non-reconnaissance de l'Ag par certains réactifs immunologiques), soit, généralement, au niveau des gènes X et pol, induisant une faible réplication virale. Dans ces cas très particuliers, il est recommandé de tester d'autres marqueurs (anticorps spécifique de l'Ag HBs ou, si possible, ADN viral amplifié) pour un diagnostic final de l'infection.
- Afin de vérifier la spécificité de la réaction, tout échantillon trouvé positif (selon les critères d'interprétation du test Monolisa™ HBs Ag ULTRA) devrait être confirmé par une technique de neutralisation des Ag HBs éventuellement présents dans l'échantillon (test Monolisa™ HBs Ag confirmation, référence 72208).
- La méthode colorimétrique de vérification du dépôt des échantillons et/ou des conjugués et/ou de la solution de révélation ne permet pas de vérifier l'exactitude des volumes distribués mais seulement de montrer la présence d'échantillons et/ou de conjugué. Le taux de réponses erronées obtenues avec cette méthode est liée à la précision du système utilisé (des CV cumulés de pipetage et de lecture supérieurs à 10% peuvent dégrader significativement la qualité de cette vérification).
- Dans le cas d'un lavage inefficace après l'étape d'incubation du conjugué, la vérification automatique de la distribution de la solution de révélation (par lecture à 490 nm des densités optiques des cupules) peut donner des résultats erronés avec des densités optiques supérieures à 0.100 en l'absence de solution de révélation. Cependant, ce phénomène n'a pas été observé durant les évaluations conduites sur 939 échantillons testés.

17 - RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. COUROUCE A.M., LEE H., DROUET J., CANAVAGGIO M. and SOULIER J.P. (1983)
   Monoclonal antibodies to HBs Ag : a study of their specificities for eight different HBs subtypes. Developments in Biological Standardization, 54, 527-534.
2. COUROUCE A.M., PLANCON A. and SOULIER J.P. (1983)
   Distribution of HBs Ag subtypes in the world. Vox Sang. 44, 197-211.
3. DAVID G.S., PRESENT W., MARTINIS J., WANG R., BATHOLOMEW R., DESMOND W. and SEVIER E.D., (1981)
   Monoclonal antibodies in the detection of hepatitis infection. Medical Laboratory Sciences, 38, 341-.348.
4. DROUET J., COUROUCE A.M., KALIL J., LEE H., and FELLOUS M. (1981)
   Monoclonal antibodies to HBs Ag produced by murine hybridomas. In viral hepatitis, edited by Szmuness W. Alter H.J., Maynard J.E. The Franklin Institute Press, 706.
5. FIELDS H.A., DAVID C.L., BRADLEY D.W. and MAYNARD J.E. (1983)
   Experimental conditions affecting the sensitivity of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of hepatitis B surface antigen (HBs Ag) - Bulletin of the World Health Organization, 61, 1, 135-142.
6. LEE H.H., COUROUCE A.M., PERE M., CANAVAGGIO M., DROUET J. and SOULIER J.P. (1983)
   Monoclonal antibodies to HBs Ag; a study of their specificities against HBs Ag subtypes and their utilization in ELISA. International Association of Biological Standardization. International Symposium on Monoclonal Antibodies : Paris, France.
7. SOULIER J.P., COUROUCE A.M., LEE H. DROUET J., MULLER A. and CANAVAGGIO M. (1983)
   Monoclonal antibodies against HBs antigen. Bulletin Biotest (vol. 4, 353-358).
8. WANDS J.P., CARLSON R.L., SCHOEMAKER H., ISSELBACHER K.J. and ZURAWSKI V.R. (1981)
   Immunodiagnosis of hepatitis B with high-affinity IgM monoclonal antibodies. Proc. Nat. Acad. Sci., 78, 2, 1214-1218.
9. M. CANAVAGGIO, A.M. COUROUCE, M. PERE, H. LEE
   Spécificité d'anticorps monoclonaux dirigés contre le déterminant a de l'Ag HBs (1985). Nouvelle Revue Française d'Immunohématologie (Springer International), 27, 2, 134.
10. J. DROUET, G. CHARRIER, A.M. COUROUCE, M. PERE, J.F. DELAGNEAU, J. ROISIN (1985)
    Nouveaux réactifs de dépistage de l'Ag HBs et de dosage de l'anticorps anti-HBs. Nouvelle Revue Française d'Immunohématologie (Springer International), 27, 2, 134.

(GB) - CE marking (European directive 98/79/CE on *in vitro* diagnostic medical devices)
(FR) - Marquage CE (Directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro*)
(ES) - Marcado CE (Directiva europea 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico *in vitro*)
(IT) - Marchiatura CE (Direttiva europea 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici *in vitro*)
(DE) - CE Konformitätskennzeichnung (Europäische Richtlinie 98/79/EG über *In-vitro*-Diagnostika)
(PT) - Marcação CE (Directiva europeia 98/79/CE relativa aos dispositivos médicos de diagnóstico *in vitro*)
(SE) - CE-märkning (Europeiskt direktiv 98/79/EG om medicintekniska produkter för *in vitro*-diagnostik)
(DK) - CE-mærkningen (Europa direktiv 98/79/EF om medicinsk udstyr til *in vitro*-diagnostik)
(GR) - Χαρακτηρισμος CE (ευρωπαικη οδηγια 98/79/CE περι *in vitro* διαγνωστικες ιατρικες συσκευες)
(PL) - CE oznaczenie (Dyrektywa unijna 98/79/CE dotycząca produktów medycznych do badań *in vitro*)
(LT) - CE ženklas (Europos sąjungos direktyva 98/79/CE dėl *in vitro* diagnostikos medicinos prietaisų)
(HU) - CE jelzés (98/79/CE Európai Irányelv az *in vitro* orvosi diagnosztikai eszközökről)
(EE) - CE märgistus (Euroopa direktiiv 98/79/CE *in vitro* diagnostikameditsiiniseadmete kohta)
(SK) - CE označenie o zhode (Európska direktíva 98/79/CE pre *in vitro* diagnostické zdravotnícke postupy)
(CZ) - CE značka (Evropská direktiva 98/79/CE o diagnostických zdravotnických prostředcích *in vitro*)
(NO) - CE-merking (EU-direktiv 98/79/CE om medisinsk utstyr til *in vitro*-diagnostikk)
(RO) - Marca CE (Directiva europeana 98/79/CE pentru dispozitive medicale de diagnostic *in vitro*)
(BG) - CE маркировка (Европейска директива 98/79/CE за *ин витро* диагностичните медицински изделия)

IVD

(GB) - For *in vitro* diagnostic use
(FR) - Pour diagnostic *in vitro*
(ES) - Para diagnóstico *in vitro*
(IT) - Per uso diagnostico *in vitro*
(DE) - *In-vitro*-Diagnostikum
(PT) - Para uso em diagnóstico *in vitro*
(SE) - *In vitro*-diagnostik
(DK) - *In vitro* diagnose
(GR) - Για *in vitro* διαγνωστικη χρηση
(PL) - Do stosowania *in vitro*
(LT) - *in vitro* diagnostikai
(HU) - Csak *in vitro* diagnosztikai alkalmazásra
(EE) - *In vitro* diagnostiliseks kasutamiseks
(SK) - Na diagnostiku *in vitro*
(CZ) - Pro diagnostiku *in vitro*
(NO) - Til *in vitro*-diagnostikk
(RO) - Pentru diagnostic *in vitro*
(BG) - За *ин витро* диагностика

REF

(GB) - Catalogue number
(FR) - Référence catalogue
(ES) - Número de catálogo
(IT) - Numero di catalogo
(DE) - Bestellnummer
(PT) - Número de catálogo
(SE) - Katalognummer
(DK) - Katalognummer
(GR) - Αριθμος καταλογου
(PL) - Numer katalogu
(LT) - Katalogo numeris
(HU) - Cikkszám
(EE) - Katalooginumber
(SK) - Katalógové číslo
(CZ) - Katalogové číslo
(NO) - Katalognummer
(RO) - Număr de catalog
(BG) - Каталожен номер

(GB) - Manufacturer
(FR) - Fabricant
(ES) - Fabricante
(IT) - Produttore
(DE) - Hersteller
(PT) - Fabricante
(SE) - Tillverkad av
(DK) - Fremstillet af
(GR) - Κατασκευαστης
(PL) - Producent
(LT) - Gamintojas
(HU) - Gyártó
(EE) - Tootja
(SK) - Výrobca
(CZ) - Výrobce
(NO) - Produsent
(RO) - Producător
(BG) - Производител

EC REP

(GB) - Authorised Representative
(FR) - Représentant agréé
(ES) - Representante autorizado
(IT) - Distributore autorizzato
(DE) - Bevollmächtigter
(PT) - Representante Autorizado
(SE) - Auktoriserad representant
(DK) - Autoriseret repræsentant
(GR) - Εξουσιοδοτημενος αντιπροσωπος
(PL) - Upoważniony Przedstawiciel
(LT) - Įgaliotasis atstovas
(HU) - Meghatalmazott Képviselő
(EE) - Volitatud esindaja
(SK) - Autorizovaný zástupca
(CZ) - Zplnomocněný zástupce
(NO) - Autorisert representant
(RO) - Reprezentant autorizat
(BG) - Упълномощен представител

LOT

(GB) - Batch code
(FR) - Code du lot
(ES) - Código de lote
(IT) - Codice del lotto
(DE) - Chargen-Bezeichnung
(PT) - Código do lote
(SE) - Batchnr
(DK) - Batchkoden
(GR) - Κωδικας παρτιδας
(PL) - Numer serii
(LT) - Serijos numeris
(HU) - Gyártási szám
(EE) - Partii kood
(SK) - Číslo šarže
(CZ) - Číslo šarže
(NO) - Partikode
(RO) - Număr de lot
(BG) - Партиден номер

(GB) - Expiry date YYYY/MM/DD
(FR) - Date de peremption AAAA/MM/JJ
(ES) - Estable hasta AAAA/MM/DD
(IT) - Da utilizzare prima del AAAA/MM/GG
(DE) - Verwendbar bis JJJJ/MM/TT
(PT) - Data de expiração AAAA/MM/DD
(SE) - Utgångsdatum ÅÅÅÅ/MM/DD
(DK) - Anvendes før ÅÅÅÅ/MM/DD
(GR) - Ημερομηνια ληξης YYYY/MM/DD
(PL) - Data ważności YYYY/MM/DD
(LT) - Galioja iki YYYY/MM/DD
(HU) - Szavatossági idő ÉÉÉÉ/HH/NN
(EE) - Aegumistähtaeg AAAA/KK/PP
(SK) - Použiteľné do RRRR/MM/DD
(CZ) - Datum exspirace RRRR/MM/DD
(NO) - Utløpsdato ÅÅÅÅ/MM/DD
(RO) - Data expirarii AAAA/LL/ZZ
(BG) - Срок на годност година/месец/ден

(GB) - Storage temperature limitation
(FR) - Limites de températures de stockage
(ES) - Temperatura límite
(IT) - Limiti di temperatura di conservazione
(DE) - Lagertemperatur
(PT) - Limites de temperatura de armazenamento
(SE) - Temperaturbegränsning
(DK) - Temperaturbegrænsning
(GR) - Περιορισμος θερμοκρασιας αποθηκευσης
(PL) - Temperatura przechowywania
(LT) - Saugojimo temperatūriniai apribojimai
(HU) - Tárolási hőmérsékleti határok
(EE) - Piirangud säilitustemperatuurile
(SK) - Skladovacia teplota od do
(CZ) - Teplotní rozmezí od do
(NO) - Oppbevaringstemperatur
(RO) - Limitele de temperatură la stocare
(BG) - Температурни граници на съхранение

(GB) - Consult Instruction for use
(FR) - Consulter le mode d'emploi
(ES) - Consulte las instrucciones de uso
(IT) - Consultare le istruzioni per uso
(DE) - Siehe Gebrauchsanweisung
(PT) - Consulte o folheto informativo
(SE) - Se bruksanvisningen
(DK) - Se instruktion før brug
(GR) - Συμβουλευθειτε τις οδηγιες χρησης
(PL) - Sprawdź instrukcję
(LT) - Ieškokite informacijos vartojimo instrukcijoje
(HU) - Olvassa el a használati utasítást
(EE) - Kasutamisel vaata instruktsiooni
(SK) - Katalógové číslo
(CZ) - Viz návod k použití
(NO) - Se bruksanvisninger
(RO) - Consultati prospectul de utilizare
(BG) - Виж инструкцията за употреба

Bio-Rad
3, bd Raymond Poincaré
92430 Marnes-la-Coquette - France
Tél.: +33 1 47 95 60 00
Fax.: +33 1 47 41 91 33

CE 0459

01/2009
Code: 883567